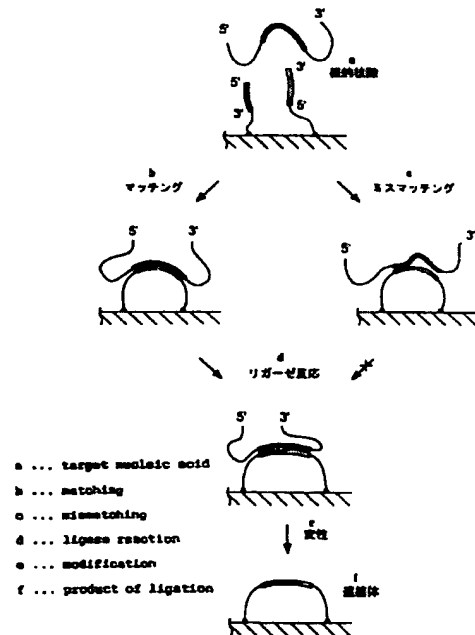




(51) 国際特許分類 C12N 15/11, 15/10, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/566	A1	(11) 国際公開番号 WO98/11210 (43) 国際公開日 1998年3月19日(19.03.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03232 (22) 国際出願日 1997年9月12日(12.09.97) (30) 優先権データ 特願平8/243720 1996年9月13日(13.09.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所 (LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 阿部 聡(ABE, Satoshi)[JP/JP] 〒434 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所内 Shizuoka, (JP) 佐藤至弘(SATO, Yoshihiro)[JP/JP] 〒471 愛知県豊田市大林町八丁目6-247 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: SOLID PHASE FOR TARGET NUCLEIC ACID DETECTION, PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF, AND METHOD OF TARGET NUCLEIC ACID DETECTION (54)発明の名称 標的核酸検出用固相、その製造方法、及び標的核酸検出方法 (57) Abstract A solid phase for target nucleic acid detection which has a base sequence hybridizable in sequence with a specified polynucleotide sequence of a target nucleic acid and contains a set of probes with their spatial arrangement immobilized onto the solid phase through a linker portion so as to be enzymatically ligated during the hybridization; and a method of target nucleic acid detection which comprises hybridizing the solid phase with the target nucleic acid, ligating the probes by a ligase reaction, and detecting the product of ligation.		



(57) 要約

本発明に係る標的核酸の検出用固相は、標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、前記固相上にリンカー部を介して空間配置が固定された1組のプロープを有する。本発明に係る標的核酸検出方法は、上記固相と標的核酸とをハイブリダイズさせ、さらにリガーゼ反応によりプロープを連結して連結体を形成しその連結体を検出するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロバキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャド
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	ID	インドネシア	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	US	米国
CH	スイス	JF	日本	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KF	キルギスタン	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	LR	大韓民国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア			SD	スーダン		

明細書

標的核酸検出用固相、その製造方法、及び標的核酸検出方法

技術分野

本発明は、標的核酸検出用の固相、その製造方法、及びそれを用いた標的核酸検出方法に関する。

背景技術

近年の研究の進展により、種々の生物情報が遺伝子の配列から得ることが出来るようになった。それに伴い当該遺伝子を検出（標的核酸中の特定のポリヌクレオチド配列に対応する）することにより、医療分野においては疾病の存在、薬物に対する感受性、臓器移植の適合性などを診断することが、食品分野においては食中毒の原因になる様々な病原体を検出したり同定することが可能になった。

このような特定のポリヌクレオチド配列を検出するためには、一般に、検出しようとする配列と相補的な配列からなるプローブを用いたハイブリダイゼーション法が行われている。検出しようとする配列は目的に応じて多岐にわたるので、検出には目的に応じた種々の配列のプローブが用いられる。また、ひとつの検体から複数の配列の存在を確認するために一度に数十から数百のプローブとの反応を調べなければならない場合もある。

このように多数のプローブとの反応を簡便に調べる手法としては、一般に、プローブを固定したフィルター等の固相を用いる方法が知られている。図1には、固相に固定されたプローブを用いて標的核酸をハイブリダイズさせて検出する方法が概念的に示されている。この方法は複数のプローブを単一の固相上に位置を隔てて配することにより、一度にたくさんのプローブとの反応を同時に、しかも少量の検体を用いるだけで検出することが出来る。しかしながら、一般に固相に

固定したプローブを用いる方法は、プローブが固相化による運動制限を受けるため標的配列との反応効率が低く、しかも、検体と固相の非特異的吸着に基づくバックグラウンドシグナルが生じるため高感度な検出は難しい。さらに、ハイブリダイゼーション法に共通する問題として、ハイブリダイゼーションに基づく核酸相互の結合は配列間に多少のミスマッチがあっても起こることから配列認識能が低いことがあげられる。

ハイブリダイゼーション法の感度と配列認識能を改善する方法としてProc.Nat l.Acad.Sci.USA(1990) 87, 8923-8927にオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイが開示されている。この方法は、図2に概念的に示されているように、標的配列と連続してハイブリダイズ可能な2本の核酸の一方に固相と結合するための基を、他方に検出のための基を導入した2つのプローブを標的核酸と反応させた後、リガーゼを加えることにより正しくハイブリダイズしたプローブのみ連結する。これらの反応はプローブがあらかじめ固定化されている方法とは異なり、各分子が自由に運動している液相中で行われるので効率がよく、しかも、リガーゼによる連結反応は僅か1塩基の違いがあっても起こらないほど厳密に行われるのでハイブリダイゼーションのみに基づく検出法よりも配列認識は高い。リガーゼにより連結されたプローブは固相と結合させることで容易に分離でき、検出のために導入した基を介して検出される。しかしながら、この方法は検出しようとする配列が多岐にわたる場合、測定者が自ら検出しようとする配列に応じて異なるプローブを添加しなければならないことから、測定者に無用な緊張を与えるうえ、誤添加等を誘発しやすい。さらに、複数のプローブを同時に反応させたとき、どの配列に対応するプローブが検出されたかを識別することは困難である。

従って、多数のプローブの反応を、固相に配したプローブを用いて簡便に、しかも、少量の検体を用いるだけで、高感度にかつ高配列認識能で検出できる方法が求められている。

発明の開示

本発明の目的は、以上の問題点を解決し、より簡便により迅速にサンプル中の多種類の標的核酸を同時に高精度に検出し、又は標的核酸中に含まれる多数の塩基配列群を同時にかつ高精度に検出するための標的核酸検出用固相、その製造方法、及び標的核酸検出方法を提供することにある。

本発明者は鋭意研究し、より簡便に、より迅速にサンプル中の多種類の標的核酸を同時に高感度に検出可能とする標的核酸検出用の固相と、その固相の製造方法と、さらにその固相を用いた標的核酸検出方法を見出した。

すなわち、本発明は、標的核酸の検出用固相であって、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、かつ、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、前記固相上にリンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプロープを有することを特徴とする検出用固相を提供するものである。

また、本発明は、上記の標的核酸の検出用固相であって、前記リンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプロープが前記標的核酸とハイブリダイズして複合体を形成することにより得られることを特徴とする検出用固相を提供するものである。

また、本発明は、上記記載の検出用固相であって、前記1組のプロープの少なくとも1つがパッドロックプロープとハイブリダイズ可能な塩基配列をさらに有することを特徴とする検出用固相を提供するものである。

さらに、本発明は、標的核酸の検出用固相の製造方法であって、
(1) 前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有する1組のプロープと、前記標的核酸とをハイブリダイズして複合体を形成するステップと、(2) 前記複合体を形成する前記1組のプロープ

をリンカー部を介して固相表面上に固定するステップと、(3) 前記標的核酸を変性して除去するステップとを含むことを特徴とする製造方法を提供するものである。

また、本発明は、上記記載の製造方法であって、

前記リンカー部がピオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの結合反応により形成されることを特徴とする製造方法を提供するものである。

また、本発明は、上記記載の製造方法であって、

前記1組のプロープの少なくとも1つがパッドロックプロープとハイブリダイズ可能な塩基配列をさらに有することを特徴とする製造方法を提供するものである。

さらに、本発明は、上記記載の製造方法により製造されたことを特徴とする検出用固相を提供するものである。

さらに、本発明は、標的核酸の検出方法であって、

(1) 前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、かつ、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、リンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプロープを有する標的核酸の検出用固相と、前記標的核酸とをハイブリダイズして複合体を形成するステップと、(2) 前記複合体のリガーゼ反応により、前記1組のプロープを連結して連結体を形成するステップと、(3) 前記連結体を検出するステップとを有することを特徴とする検出方法を提供するものである。

また、本発明は、上記記載の検出方法であって、

前記連結体を検出するステップにおいて、前記連結体の耐エキソヌクレアーゼ消化活性に基いて前記連結体を検出することを特徴とする検出方法を提供するものである。

また、本発明は、上記記載の検出方法であって、

前記連結体の耐エキソヌクレアーゼ消化活性を、前記標的核酸の検出用固相の

質量変化に基づき検出することを特徴とする検出方法を提供するものである。

また、本発明は、上記記載の検出方法であって、

前記標的核酸の検出用固相の質量変化を、表面プラズモン共鳴方法に基づいて測定した屈折率の変化から検出することを特徴とする検出方法を提供するものである。

また、本発明は、標的核酸の検出方法であって、

(1) 前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列と、パッドロックプローブとハイブリダイズ可能な塩基配列とを有し、かつ、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、リンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプローブを有する標的核酸の検出用固相と、前記標的核酸とをハイブリダイズして複合体を形成するステップと、(2) 前記複合体のリガーゼ反応により、前記1組のプローブを連結して連結体を形成するステップと、(3) 前記連結体と、前記パッドロックプローブとをハイブリダイズするステップと、(4) リガーゼ反応により前記パッドロックプローブを、前記連結体と連環状に閉環するステップと、(5) 前記閉環したパッドロックプローブを検出するステップとを有することを特徴とする検出方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、固相に固定した単一のプローブと特定のポリヌクレオチド配列をハイブリダイズして検出する方法を示す図である。

図2は、2種類のプローブと特定のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズした後、リガーゼ反応により連結して固相に固定して検出する方法を示す図である。

図3は、本発明に係る標的核酸検出用固相を用いて標的核酸を検出する方法を示す図である。

図4は、本発明に係る標的核酸検出用固相の調製方法の1例を示す図である。

図5は、連結体を検出する方法であって、連結体を形成したプローブはエキソヌクレアーゼIとは反応せず、特定のポリヌクレオチド配列がない場合またはミスマッチングの場合の連結体を形成しないプローブはエキソヌクレアーゼIにより分解されることを示す図である。

図6は、パッドロックプローブ用オリゴヌクレオチド配列を有するプローブを用いて特定のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、リガーゼ反応により得た連結体に、さらにパッドロックプローブをハイブリダイズおよびリガーゼ反応をさせ連環状体を形成する方法を示す図である。

図7は、プローブをエネルギードナーおよびエネルギーアクセプターでラベルし、特定のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズし、リガーゼ反応の後に得られる連結体を検出するために、ラベル間のエネルギードナーアクセプター相互作用に基づいて検出する方法を示す図である。

図8は、本発明に係る方法を用いた多配列を同時に高精度で検出する方法の実施の一形態を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明に係る標的核酸検出用固体、標的核酸検出方法についてより詳細に説明する。

(標的核酸)

本発明においては標的核酸の種類については、特に制限はされず、各種の核酸(DNA、RNA、オリゴヌクレオチド等)に適用可能である。また標的核酸の長さにおいても特に制限はなく目的に応じて、適当な処理により適当な長さに調製したものにも使用可能である。本発明は図3にその概念が示されるように、標的核酸中の特定のポリヌクレオチド配列を検出する方法であって、この特定のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能な塩基配列を有する2種類のプローブ

を用いるものである。従って、この特定のポリヌクレオチド配列はあらかじめ知られている必要があるが、その数については特に制限はない。十分な認識を可能とし、かつ以下で説明するリガーゼ反応に適するため本発明において特定のポリヌクレオチド配列は少なくとも20塩基数あればよい。さらに好ましくは30塩基以上である。またその特定のポリヌクレオチドの標的核酸中での位置についても特に制限はない。末端付近でも中間部分でもよい。

さらに、本発明に係る方法を使用する際には、ハイブリダイズさせるために少なくとも上記特定のポリヌクレオチド配列部分は1重鎖である必要があるが、標的核酸が2重鎖である場合には、通常の、熱またはアルカリ変性等の方法により容易に1重鎖とすることが可能である。

(1組のプロープ)

本発明に係る1組のプロープは、上記の標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列部分と相補的な塩基配列を有するものであり、上記の特定のポリヌクレオチド配列部分と連続してハイブリダイズするものである。それぞれのプロープの塩基配列の数には特に制限はない。本発明においては、塩基配列数は約10以上あればよく、好ましくは15以上である。塩基数が少ない場合は十分な特異的認識作用がなく、またあまりに多いと取扱性、保存性などに問題を生じる。

さらに、それぞれのプロープには以下で説明する検出用固相に固定するためのリンカー部を有するものである。

(検出用固相)

本発明において検出用固相とは、固相媒体であって、その表面上に、上記説明した2種類のプロープが隣接して結合されたものである。その結合の密度等については特に制限はなく、種々の密度で結合されたものが使用可能である。さらに、固相媒体の種類についても制限はなく、例えば、無機物質固相媒体、または有機物質固相媒体等使用可能である。無機物質固相媒体には、具体的には種々の金属膜、シリカゲル、アルミナ、ガラス等が挙げられる。有機物質固相媒体には、ニ

トロセルロース膜、ナイロン膜等が挙げられる。本発明においては特に金属膜にデキストランを結合したものの使用が好ましい。

(リンカー部)

本発明において検出用固相と上記2種類のプロープはリンカー部を介して結合するものである。リンカー部の種類、形状等には特に制限はない。上記2種類のプロープと標的核酸をハイブリダイズする条件、それに伴う洗浄操作、さらに該標的核酸を除去する操作等において充分強固な結合性を有していればよい。

具体的には、通常の化学結合を利用したもの、タンパク質同士の相互作用に基づく結合、タンパク質と特定の分子との強い相互作用に基づく結合等を利用したもの等が挙げられる。本発明においては、特にタンパク質と特定の分子との強い相互作用に基づく結合が好ましく用いられる。より具体的には、ビオチンとアビジン、ビオチンとストレプトアビジンとの結合である。この際プロープにビオチンを結合し、固相にアビジンまたはストレプトアビジンを結合させる組合せが好ましいが、特に限定されるものではない。

(空間配置)

本発明に係る検出用固相は、2種類のプロープが特定の空間配置を有するように固相上に固定されたものである。すなわち、上記プロープが標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズし、さらに、酵素反応により連結され得る空間配置である。

上記の特定の空間配置にプロープを固定する方法には、例えば、上記2種類のプロープが好ましい濃度になるようにあらかじめ混合し、その混合物を検出用固相表面と反応させ、リンカー部で結合する方法がある。この場合、2種類のプロープは上記表面にランダムに結合したものが得られる。この場合においては、上記2種類のプロープの空間配置のうち、標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズし、さらに、酵素反応により連結され得る空間配置をとるものは極めて少数であると考えられる。

本発明においては、好ましい空間配置にある1組のプロープをより多く固相上に固定するための方法として、以下の手段が好ましく使用可能である（図4参照）。

2種類のプロープをまず標的核酸と混合してハイブリダイズさせる。得られたハイブリッド体を検出用固相上で結合反応させ、ハイブリッド体を固定する。上記固相を充分洗浄後、ハイブリッド体から標的核酸を熱、またはアルカリ処理等で除去する。

以上の操作により、2種類のプロープが標的核酸とハイブリダイズするために好ましい空間配置で固相上に固定されることになる。

なお、このとき用いる標的核酸は、上記2種類のプロープのポリヌクレオチド配列部分と必ずしも完全相補的に連続した配列を有している必要はなく、上記の2種類のプロープの末端同士を近接してハイブリダイズ可能であればよい。

（ハイブリダイズの条件）

本発明において、本発明に係る1組のプロープと標的核酸とのハイブリダイズ条件は特に制限なく通常の条件を使用可能である。例えば、「分子生物学実験マニュアル」（川上正也監修；講談社）172ページに記載の方法に準じて、または修正して使用できる。また、形成されるハイブリダイズ体から標的核酸を除き、1本鎖にする条件は特に制限はなく、通常公知の条件が好ましく使用可能である。例えば、アルカリ処理、または熱処理、酸処理等である。

（酵素）

本発明においては、1組の2種類のプロープを結合するために用いることができる酵素は例えば、リガーゼが挙げられる。リガーゼの種類および反応条件については、特に制限はなく通常の選択に基づいて種々の公知のリガーゼ反応を使用可能である。

さらに、リガーゼ反応に基づく連結後は、種々の操作（例えば、熱処理、アルカリ処理、酸処理等）に基づき、標的核酸を除去することが可能である。

(検出方法)

本発明に係る標的核酸の検出方法は、図3に示されるように、本発明に係る検出用固相を用いるものであって、前記検出用固相上の1組のプロープを標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズさせ、得られるハイブリダイズ体(複合体)のリガーゼ反応により上記2種類のプロープ間を結合して得られる連結体を検出するものである。

また、標的核酸の塩基配列が異なり、プロープが誤認識した場合には、リガーゼ反応により上記連結体の形成は生じないこととなる。従って、上記リガーゼ反応の後に、アルカリ処理等で標的核酸を除いた場合には、上記プロープ同士が連結されず、それぞれの末端部が存在することとなる。すなわち1組のプロープは最初の状態に戻るものとなる。

本発明は、得られた上記連結体を種々の手段で検出することで、上記リガーゼ反応が起ったことを知り、従って、標的核酸の存在を知ることができるものである。この際リガーゼ反応は極めて高い特異性を有していることから、誤認識の程度を極めて低いレベルにすることが可能となるものである。

本発明に係る上記連結体の検出手段については以下に説明するように種々の公知の方法が使用できる。

例えば、図5に示されるように、エキソヌクレアーゼ反応(例えばエキソヌクレアーゼI、VII等)を利用するものである。例えば、上記連結体を形成しない場合には、検出用固相上の1組のプロープは、最初の状態であり、5'及び3'末端が存在する。従って、ここに例えばエキソヌクレアーゼIの反応を行うと1つのプロープの3'末端から消化(加水分解)される。一方、連結体には3'末端が存在せず、ここにエキソヌクレアーゼIの反応を行ってもプロープは消化されない。従って、加水分解生成物の存在、または加水分解されたプロープの存在を検出することで上記閉環状構造体の存在を検出することができる。この目的のため、あらかじめプロープを種々の標識体(蛍光、放射性同位元素等)でラベル

化しておくか、または固相上の核酸の質量減少を、例えば表面プラズモン共鳴方法等により検出することでプローブの消化を確認することが出来る。

また、図6で示されるように、上記検出方法の1つとして、前記連結体とパッドロックプローブとをハイブリダイズし、さらにそのパッドロックプローブをリガーゼ反応により前記連結体と連環状に閉環し、閉環したパッドロックプローブを検出する方法がある。必要とあれば、さらにこの操作を繰返すことにより、複数のパッドロックプローブを付加して反応を増幅することも可能である。パッドロックプローブのラベル化は蛍光分子によるもの、放射性同位元素によるもの等がある。ここで、パッドロックプローブとは、被検配列とハイブリダイズする2つのセグメントをリンカー配列でつないだプローブで、被検配列とハイブリダイズしたときに末端を隣接して環状化するオリゴヌクレオチドプローブを意味する (Science(1994), 265, 2085-2088)。

さらに上記連結体を検出する手段としては、図7に示されるように、あらかじめ上記2つのプローブにそれぞれラベル化を施し、上記連結体が形成されることにより、該ラベル化基間が特定の位置を保持するため、特異的相互作用が生じ、それを検出することにより上記連結体の存在を知ることができる。この場合好適に使用されうるラベル化は例えば、分子間の蛍光エネルギー移動現象に基づくものである。例えば、エネルギードナー性の蛍光分子と、エネルギーアクセプター性の蛍光分子でそれぞれラベル化したプローブを用いると、プローブが連結したときには蛍光エネルギー移動に基づき光励起されたエネルギードナー性の蛍光分子が隣接するエネルギーアクセプター性の蛍光分子を励起するので、エネルギーアクセプター性の蛍光分子から蛍光が生じることになり、その蛍光を観測することで上記連結体を検出することが出来る。

(多配列同時高精度標的核酸検出)

本発明に係る方法により、被検体サンプル (例えば1つのDNA等または多種のDNAの混合物) 中の種々の標的核酸を同時に多種類検出することが可能とな

る。例えば、(a)固相（例えばフィルタ）上に、上記説明した本発明に係るプローブ（それぞれの標的核酸中の特定のポリヌクレオチド配列に効率良くハイブリダイズ可能なように位置されている）を用意する。(b)サンプル中にある標的核酸の混合物を一度に反応させ、さらに一度にリガーゼ反応を行う。これらの操作により、標的核酸のそれぞれの特定のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズ（及びリガーゼ反応）して連結体を形成することになる。(c)この連結体を上記説明した種々の方法で検出することで、同時に多種類の標的核酸の配列の存在を検出することができる。

例えば図8において多配列同時高精度標的核酸検出方法の実施の一形態を示した。まず、検出されるべき核酸の特定のポリヌクレオチド配列が1から5の5種類ある場合、それぞれの特定位置に特定のポリヌクレオチド配列1～5までに対応する1組のプローブ群を用意する。この場合本発明の説明で記載された図4に例示する方法で調製することが好ましい。すべての位置で、標的核酸をハイブリダイズさせ、余分のサンプル等を洗浄して除去する。さらにすべての位置でリガーゼによる結合反応を行うと、対応する特定のポリヌクレオチドの配列が存在する場合においてのみ連結体が形成されることになる。図8では1と3と5である。この後、得られた連結体を検出する手段は、すでに説明した種々の方法が使用できる。連結体の存在が確認された位置から、被検体サンプル中に存在する複数の標的核酸を検出する。

以下実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

核酸の合成は、一般的に、ホスホロアミダイト固相合成法による自動核酸合成機にて合成し、イオン交換高速液体クロマトグラフィー法にて精製（純度99%以上）した。5'リン酸化は5' Phosphate-ONを用いた。3'ビオチン（BIOTIN）化は3' Biotin-ON CPGを用いた。5'ビオチン化はBiotin Amiditeを用いた。以上の試薬はCLONTECH社から入手可能である。

(実施例1) プロープの固相化

(1-1) 3'末端をビオチン標識し、5'末端をリン酸化した20塩基のオリゴヌクレオチドからなるプロープA、5' (P) -TAGTGGATCCCCCGGGCTGC- (ビオチン) 3'を通常のスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(1-2) 5'末端をビオチン標識した20塩基のオリゴヌクレオチドからなるプロープB、5' (ビオチン) -GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3'を通常のスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(1-3) 上記2つのプロープを隣接して保持できる標的核酸として以下の配列を有するオリゴヌクレオチドからなる標的核酸Aを合成した。

5' -GCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACC-3'

(1-4) (1-1)、(1-2)で得られたプロープ(それぞれ400nM)と、(1-3)で得た標的核酸(400nM)を、1×SSPE(150mMの塩化ナトリウム、10mMのリン酸二水素ナトリウム、1mMのエチレンジアミン四酢酸を含む。水酸化ナトリウムでpHを7.4に調整。)中で混合し、混合溶液を沸騰水中で3分間加熱して変性させ、その後55℃に10分保つことによりハイブリダイズさせた。

(1-5) (1-4)で調製した複合体をストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップSA5(ファルマシア バイオテック製)と37℃で4分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置(BIAcore2000;ファルマシア バイオテック製)にて観察したところ、1035~1460レゾナンスユニット(表面プラズモン共鳴における反射光の減衰角度を表す値で、固相表面の質量変化を反映する)の上昇を認め、複合体がビオチン-ストレプトアビジンの結合を介してセンサーチップ上に結合したことを

示した。

(1-6) (1-5)で複合体を結合した固相に10 mMの水酸化ナトリウム溶液を37℃で1分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ、622~859レゾナンスユニットの減少を認め、2つのプローブを隣接して保持していた配列がアルカリ変性により解離したことを示す。

(1-7) (1-6)で2つのプローブを隣接して保持していた配列が解離した固相に、再度同じ標的核酸A(2250 nM)を1×SSPE中にて37℃で4分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、656~704レゾナンスユニットの上昇を認め、(1-6)で調製された固相が標的核酸の配列とハイブリダイズすることを確認した。また、このときの結合量は(1-6)で除去された2つのプローブを隣接して保持するために用いた標的核酸の量とほぼ等しく、この結果は(1-6)で調製された固相が極めて効率良く標的核酸と結合することを示すものである。

(実施例2) 固相上でのリガーゼ連結反応(液相中で標的核酸の特定の配列とハイブリダイズしたプローブを固相上で連結)

(2-1) (実施例1)の(1-1)、(1-2)で得られたプローブ(それぞれ400 nM)と(1-3)で得られた2つのプローブを隣接して保持することができる配列(400 nM)を1×SSPE中で混合し、沸騰水中で3分間加熱して変性させ、その後55℃に10分間保つことによりハイブリダイズさせた。

(2-2) (2-1)で調製したプローブと2つのプローブを隣接して保持することができる配列の複合体をストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップSA5と37℃で4分間反応させ、ビオチン-ストレプトアビジンの結合を介して結合した。

(2-3) (2-2)で複合体を結合した固相に添付の反応緩衝液で希釈した

T4 DNAリガーゼ (T4 DNA Ligase、3500 IU/ml; 宝酒造製) を 37℃ で 20 分間反応させた後、0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) で 2 回洗浄 (各 37℃ 1 分間) して酵素を除去し、さらに 10 mM の水酸化ナトリウム溶液を 37℃ で 1 分間反応させて 2 つのプローブを隣接して保持していた配列を解離した。

(2-4) (2-3) の操作を行った固相に 10 mM の 2-メルカプトエタノールと 6.7 mM の塩化マグネシウムを含む 67 mM のグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) で希釈したエキソヌクレアーゼ I (2500 unit/ml; アマシャム製) を 37℃ で 20 分間反応させた後、0.1% SDS で 2 回洗浄 (各 37℃ 1 分間) して酵素を除去した。この操作における固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ、93~103 レゾナンスユニットの減少に留まったが、(2-3) でリガーゼを作用させなかった場合には 177~213 レゾナンスユニットもの固相質量の減少を認めた。この結果は、標的配列により隣接して保持された 2 つのプローブが、固相上でリガーゼにより連結されてエキソヌクレアーゼ消化に対して耐性になることを示している。

(実施例 3) 固相上でのリガーゼ連結反応 (固相上で標的核酸の特定配列とハイブリダイズしたプローブを固相上で連結)

(実施例 1) の (1-7) で得られた固相上でプローブと標的核酸の特定配列と再結合させた固相を用いて、(実施例 2) の (2-3) に示したリガーゼによる連結を行った後に、10 mM の水酸化ナトリウム溶液を 37℃ で 1 分間反応させ標的核酸を解離し、(2-4) に示した方法でエキソヌクレアーゼ消化による固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ、65 レゾナンスユニットの減少に留まったが、リガーゼを作用させなかった場合には 163 レゾナンスユニットもの固相質量減少の変化を認めた。この結果は、固定媒体に結合した 2 つのプローブと標的核酸をハイブリダイズさせたときも、プローブ同士が

隣接し、リガーゼにより連結されることを示している。

(比較例1)

TE緩衝液(1mMのエチレンジアミン四酢酸を含む10mMトリス塩酸緩衝液; pH 8.0)で希釈したプローブA(340 nM)を沸騰水中で3分間加熱後、ただちに氷冷した試料を37℃にて4分間、ストレプトアビジンをコートしたBIAcoreセンサーチップSA5にて観察したところ90レゾナンスユニットの上昇を認めた。すなわち、1本鎖のプローブAが、単独では固相にほとんど結合できないことを示している。

(比較例2)

TE緩衝液で希釈したプローブB(775 nM)を沸騰水中で3分間加熱後、ただちに氷冷した試料を37℃にて4分間、ストレプトアビジンをコートしたBIAcoreセンサーチップSA5にて観察したところ91レゾナンスユニットの上昇を認めた。すなわち、1本鎖のプローブBが、単独では固相にほとんど結合できないことを示している。

(比較例3)

TE緩衝液で希釈したプローブC(5' (P)-TAGTGGATCCCCCGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT-(BIOTIN) 3'; 25 μM)とプローブD(5' (BIOTIN)-GCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3'; 25 μM)を等容混合し、沸騰水中で3分間加熱後、ただちに氷冷した試料を37℃にて1~4分間、ストレプトアビジンをコートしたBIAcoreセンサーチップSA5にて観察したところ84~99レゾナンスユニットの上昇を認めた。

すなわち、2つのプローブ、プローブC、Dの単なる混合では固相に充分結合

しないことを示す。

(実施例 4)

TE緩衝液で希釈したプローブC (170 nM)、プローブD (180 nM) と 1×SSPEで希釈したプローブ連結用の配列 (5' -GCAGCCCGGGG GATCCACTAAGTTCTAGAGCGGCCGCCACC-3'、この配列は実施例 1 で用いた標的核酸の配列の中間部に A を挿入した配列であり、2 つのプローブを連結して配置することが出来るが、ミスマッチを含む配列である。 ; 1.2 μM) を 2 : 2 : 1 の容量比で混合し、沸騰水中で 3 分間加熱して変性させ、その後 55℃に 10 分間保持しハイブリダイズさせた試料を 37℃にて 4 分間、ストレプトアビジンをコートした B I A c o r e センサーチップ SA 5 と反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ 330 レゾナンスユニットの上昇を認めた。

このことは、プローブ C、D をあらかじめプローブ連結用の配列とハイブリダイズさせた場合には固相化量の改善が認められることを示す。

(実施例 5)

TE緩衝液で希釈したプローブ A (340 nM)、プローブ B (775 nM) と 1×SSPEで希釈したプローブ連結用の配列 (1.2 μM) を 2 : 2 : 1 の容量比で混合し、沸騰水中で 3 分間加熱して変性させ、その後 55℃に 10 分間保持しハイブリダイズさせた試料を 37℃にて 1 分間、ストレプトアビジンをコートした B I A c o r e センサーチップ SA 5 と反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ 1173 レゾナンスユニットの上昇を認めた。

このことは、プローブ A、B をあらかじめプローブ連結用の配列とハイブリダイズさせた場合には固相化量の改善が認められることを示す。

(実施例 6)

プローブAとプローブB（それぞれ400nM）とこれらのプローブを隣接して保持できる標的核酸A（400nM）を、1×SSPE中で混合し、混合溶液を100°Cで5分間加熱変性し、その後に55°Cに10分保つことによりハイブリダイズさせ、複合体を形成した。

上記の複合体を1×SSPEで10倍に希釈し、ストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップSA5と37°Cで5分間反応し、ビオチン-ストレプトアビジンの結合を介して結合した後、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37°Cで1分間づつ順次洗浄して、標的核酸Aを除去し、標的核酸の検出用固相とした。

上記の標的核酸の検出用固相に、以下に示す配列を400nMとなるように1×SSPEで希釈した試料を37°Cで10分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、407～769レゾナンスユニットの上昇を認めた。このことはいずれの配列も固相と結合し、ハイブリダイゼーションに基づく結合量からは検出しようとする核酸配列と、これとはわずかに異なる核酸配列を区別することができないことを示している。

試料として用いた配列

標的核酸A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基欠損配列A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基欠損配列B ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA TTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基過剰配列 ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTAAGTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基置換配列A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基置換配列B ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTG GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基置換配列C ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTC GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
1塩基置換配列D ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA ATTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

1塩基置換配列 E; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA TTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

1塩基置換配列 F; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA CTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

この固相に添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNAリガーゼ (3500IU/ml) を37°Cで5分間反応させ、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37°Cで1分間づつ順次洗浄して、リガーゼならびに試料を除去した。

この固相に10mMの2-メルカプトエタノールと6.7mMの塩化マグネシウムを含む67mMのグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) で希釈したエキソヌクレアーゼ I (1000unit/ml) を37°Cで20分間反応させ、さらにTE緩衝液で30分間洗浄したときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、標的核酸Aを反応させたときは50~54レゾナンスユニットの減少に留まったが、1塩基欠損配列Aでは123と131レゾナンスユニット、1塩基過剰配列では125レゾナンスユニットもの減少が認められた。さらに、1塩基置換を伴う配列においても64~135レゾナンスユニットと、置換の種類によって差異はあるものの、標的核酸Aを反応させたときよりは大きな固相質量減少を認めた。

このことは、本法がハイブリダイゼーションに基づく結合量からは区別することができないほどのわずかな配列の違いを識別できることを示している。

=====

被検配列	固相質量の変化 (RU)		
	固相化工程	ハイブリ工程	消化工程
標的核酸 A	654	596	-54
標的核酸 A	571	527	-50
標的核酸 A	452	451	-51
1塩基過剰配列	578	407	-125
1塩基欠損配列A	571	509	-123
1塩基欠損配列B	604	502	-131
1塩基置換配列A	569	404	-68
1塩基置換配列B	565	520	-119
1塩基置換配列C	612	769	-96
1塩基置換配列D	524	493	-64
1塩基置換配列E	559	460	-85
1塩基置換配列F	575	518	-135

=====

(実施例7)

プローブAとプローブD（それぞれ400nM）とこれらのプローブを隣接して保持できる標的核酸B（5'-GCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGC-3'；400nM）を、1×SSPE中で混合し、混合溶液を100℃で5分間加熱変性し、その後に55℃に10分保つことによりハイブリダイズさせ、複合体を形成した。

上記の複合体を1×SSPEで10倍に希釈し、ストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップSA（ファルマシア バイオテク製）と37℃で5分間反応し、ビオチン-ストレプトアビジンの結合を介して結合した後、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37℃で1分間づつ順次洗浄して、標的核酸Bを除去し、標的核酸の検出用固相とした。

上記の標的核酸の検出用固相に、以下に示す配列を400nMとなるように1×SSPEで希釈した試料を37℃で10分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、352～373レゾナンスユニットの上昇を認めた。このことはいずれの配列も固相と結合し、ハイブリダイゼーションに基づく結合量からは検出しようとする核酸配列と、これとはわずかに異なる核酸配列を区別することができないことを示している。

試料として用いた配列

標的核酸A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

1塩基欠損配列A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

1塩基過剰配列 ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTAAGTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

この固相に添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNAリガーゼ（3500IU/ml）を37℃で5分間反応させ、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37℃で1分間づつ順次洗浄して、リガーゼならびに試料を除去した。

この固相に400nMとなるように1×SSPEで希釈したパッドロックプローブ（5'-G

CGGTGGAGCTCCAATTCGC TTGT
TCTAGAGCGGCCGCCACC-3') を37°Cで10分間反応させ、このときの固相の質量変化
を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、192～235レゾナンスユニットの
上昇を認めた。このことはプローブDにパッドロックプローブが結合したことを
示している。

この固相に添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNAリガーゼ (3500IU/ml) を37°C
で5分間反応させてパッドロックプローブを連結し、環状化した後、0.1%のSD
S、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37°Cで1分間ずつ順次洗浄して、
リガーゼの除去ならびにパッドロックプローブの解離を行った。このときの固相
の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、標的核酸Aを反応さ
せたときは80レゾナンスユニットの減少に留まったが、1塩基欠損配列Aでは143
レゾナンスユニット、1塩基過剰配列では130レゾナンスユニット、更に標的配列
を一切作用させなかったものでは132レゾナンスユニットもの低下を認めた。

このことは、パッドロックプローブを用いた検出方法においてもハイブリダイ
ゼーションに基づく結合量からは区別することができないほどのわずかな配列の
違いを識別できることを示している。

=====

固相質量の変化 (RU)

標的配列種類 固相化工程 ハイブリ工程 パッドロック結合 パッドロック解離

標的核酸A	524	365	192	-80
標的配列なし	531	-9	234	-132
1塩基欠損配列A	561	352	235	-143
1塩基過剰配列	518	373	221	-130

=====

(実施例8) 複合体を形成しない方法

プローブAとプローブB（それぞれ400nM）を、1×SSPE中で混合し、混合溶液を100℃で5分間加熱変性し、直ちに氷冷した。

上記のプローブを1×SSPEで50倍に希釈し、ストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップSAと37℃で5分間反応し、ビオチン-ストレプトアビジンの結合を介して結合した後、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37℃で1分間ずつ順次洗浄して、標的核酸Aを除去し、標的核酸の検出用固相とした。

上記の標的核酸の検出用固相に、以下に示す配列を400nMとなるように1×SSPEで希釈した試料を37℃で10分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、597～624レゾナンスユニットの上昇を認めた。

試料として用いた配列

標的核酸A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
 1塩基欠損配列A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'
 1塩基過剰配列 ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTAAGTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

この固相に添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNAリガーゼ（3500IU/ml）を37℃で5分間反応させ、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37℃で1分間ずつ順次洗浄して、リガーゼならびに試料を除去した。

この固相に10mMの2-メルカプトエタノールと6.7mMの塩化マグネシウムを含む67mMのグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 9.5）で希釈したエキソヌクレアーゼI（200unit/ml；アマシャム製）を37℃で20分間反応させ、さらにTE緩衝液で30分間洗浄したときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、標的核酸Aを反応させたときは39レゾナンスユニットの減少に留まったが、1塩基欠損配列Aでは121レゾナンスユニット、1塩基過剰配列では125レゾナ

ンスユニット、更に標的配列一切作用させなかったものでは174レゾナンスユニットものの低下を認めた。

このことは、あらかじめ複合体を形成しない固相化方法においても、検出しようとする核酸配列と、これとはわずかに異なる核酸配列を識別することが可能であることを示している。しかしながら、標的配列を反応させた場合も未反応プローブの消化に起因すると思われる固相の質量低下が少なからず認められ、結果が判定しにくい。

=====

固相の質量変化 (RU)

	固相化工程	ハイブリ工程	消化工程
標的核酸A	547	597	-39
標的配列なし	513	-7	-174
1塩基欠損配列A	521	624	-131
1塩基過剰配列	484	609	-125

=====

(実施例9) 複合体を形成する方法

プローブAとプローブB（それぞれ400nM）とこれらのプローブを隣接して保持できる標的核酸A（400nM）を、1×SSPE中で混合し、混合溶液を100℃で5分間加熱変性し、その後に55℃に10分保つことによりハイブリダイズさせ、複合体を形成した。

上記の液をイオン交換高速液体クロマトグラフィーカラムDNA-NPR（東ソー製）に添加し、20mMのトリス塩酸緩衝液（pH 9.0）を含む塩化ナトリウムグラジエントにて溶出し、塩化ナトリウム濃度457mM付近に認められる主たるピークを分取して複合体を得た。

この複合体をストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップSAと37°Cで10分間反応し、ビオチン-ストレプトアビジンの結合を介して結合した後、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37°Cで1分間ずつ順次洗浄して、標的核酸Aを除去し、標的核酸の検出用固相とした。

上記の標的核酸の検出用固相に、以下に示す配列を400nMとなるように1×SSPEで希釈した試料を37°Cで10分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、639～705レゾナンスユニットの上昇を認めた。

試料として用いた配列

標的核酸A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

1塩基欠損配列A ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

1塩基過剰配列 ; 5'-GCAGCCCGGG GGATCCACTAAGTTCTAGAGC GGCCGCCACC-3'

この固相に添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNAリガーゼ (3500IU/ml) を37°Cで5分間反応させ、0.1%のSDS、10mMの水酸化ナトリウム、10mMの塩酸にて37°Cで1分間ずつ順次洗浄して、リガーゼならびに試料を除去した。

この固相に10mMの2-メルカプトエタノールと6.7mMの塩化マグネシウムを含む67mMのグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.5) で希釈したエキソヌクレアーゼ I (200unit/ml) を37°Cで20分間反応させ、さらにTE緩衝液で30分間洗浄したときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴装置にて観察したところ、標的核酸Aを反応させたときはわずか7レゾナンスユニットの低下を示すだけに留まり、ほとんど質量の変化が観察されなかったが、1塩基欠損配列Aでは105レゾナンスユニット、1塩基過剰配列では113レゾナンスユニット、更に標的配列一切作用させなかったものでは160レゾナンスユニットもの低下を認めた。

このことは、あらかじめ複合体を形成する固相化方法を用いることで、標的配列とその他の配列をより明確に区別することができることを示している。

=====

固相の質量変化 (RU)

	固相化工程	ハイブリ工程	消化工程
標的核酸A	471	705	-7
標的配列なし	453	-2	-160
1塩基欠損配列A	448	639	-105
1塩基過剰配列	460	655	-113

=====

産業上の利用可能性

本発明に係る標的核酸検出用固相の製造方法に基づく標的核酸検出用固相、及び該標的核酸検出用固相を用いた標的核酸検出方法は、簡便かつ迅速に、サンプル中の多種類の標的核酸を、同時にかつ高精度に検出することを可能とし、又標的核酸中に含まれる多数の塩基配列群を同時にかつ高精度に検出することを可能とする。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：3'末端がビオチン標識され、5'末端をリン酸化

配列

TAGTGGATCC CCCGGGCTGC 20

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：5'末端がビオチン標識

配列

GGTGGCGGCC GCTCTAGAAC 20

配列番号：3

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号：4

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：3'末端がビオチン標識され、5'末端をリン酸化

配列

TAGTGGATCC CCCGGGCTGC AGCATTTCGA TATCAAGCTT 40

配列番号：5

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列の特徴：5'末端がビオチン標識

配列

GCGAATTGGA GCTCCACCGC GGTGGCGGCC GCTCTAGAAC 40

配列番号：6

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA AGTTCTAGAG CGGCCGCCAC C 41

配列番号：7

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTG TTCTAGAGCG GCCGCCACC 39

配列番号：8

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA TTCTAGAGCG GCCGCCACC 39

配列番号：9

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号：10

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTG GTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号：11

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTC GTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号：12

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA ATTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号：13

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA TTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号：14

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA CTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40

配列番号 : 15

配列の長さ : 60

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列

GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC GCGGTGGAGC TCCAATTCGC 60

配列番号 : 16

配列の長さ : 90

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : D N A

配列の特徴 : 5' 末端をリン酸化

配列

GCGGTGGAGC TCCAATTCGC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT 60
TTTTTTTTTT GTTCTAGAGC GGCCGCCACC 90

請求の範囲

1. 標的核酸の検出用固相であって、
前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、
かつ、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、前記固相上にリンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプロープを有することを特徴とする検出用固相。
2. 請求項1に記載の標的核酸の検出用固相であって、
前記リンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプロープが前記標的核酸とハイブリダイズして複合体を形成することにより得られることを特徴とする検出用固相。
3. 請求項1に記載の検出用固相であって、
前記1組のプロープの少なくとも1つがパッドロックプロープとハイブリダイズ可能な塩基配列をさらに有することを特徴とする検出用固相。
4. 標的核酸の検出用固相の製造方法であって、
 - (1) 前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有する1組のプロープと、前記標的核酸とをハイブリダイズして複合体を形成するステップと、
 - (2) 前記複合体を形成する前記1組のプロープをリンカー部を介して固相表面上に固定するステップと、
 - (3) 前記標的核酸を変性して除去するステップとを含むことを特徴とする製造

方法。

5. 請求項 4 に記載の製造方法であって、

前記リンカー部がビオチンと、アビジン又はストレプトアビジンとの結合反応により形成されることを特徴とする製造方法。

6. 請求項 4 に記載の製造方法であって、

前記 1 組のプロープの少なくとも 1 つがパッドロックプロープとハイブリダイズ可能な塩基配列をさらに有することを特徴とする製造方法。

7. 請求項 4 に記載の製造方法により製造されたことを特徴とする検出用固相。

8. 標的核酸の検出方法であって、

(1) 前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列を有し、かつ、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、リンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された 1 組のプロープを有する標的核酸の検出用固相と、前記標的核酸とをハイブリダイズして複合体を形成するステップと、

(2) 前記複合体のリガーゼ反応により、前記 1 組のプロープを連結して連結体を形成するステップと、

(3) 前記連結体を検出するステップとを有することを特徴とする検出方法。

9. 請求項 8 に記載の検出方法であって、

前記連結体を検出するステップにおいて、前記連結体の耐エキソヌクレアーゼ消化活性に基いて前記連結体を検出することを特徴とする検出方法。

10. 請求項9に記載の検出方法であって、

前記連結体の耐エキソヌクレアーゼ消化活性を、前記標的核酸の検出用固相の質量変化に基づき検出することを特徴とする検出方法。

11. 請求項10に記載の検出方法であって、

前記標的核酸の検出用固相の質量変化を、表面プラズモン共鳴方法に基づいて測定した屈折率の変化から検出することを特徴とする検出方法。

12. 標的核酸の検出方法であって、

- (1) 前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列と、パッドロックプローブとハイブリダイズ可能な塩基配列とを有し、かつ、前記標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズする際に、酵素により連結されるように、リンカー部を介して限定された空間配置をとるように固定された1組のプローブを有する標的核酸の検出用固相と、前記標的核酸とをハイブリダイズして複合体を形成するステップと、
- (2) 前記複合体のリガーゼ反応により、前記1組のプローブを連結して連結体を形成するステップと、
- (3) 前記連結体と、前記パッドロックプローブとをハイブリダイズするステップと、
- (4) リガーゼ反応により前記パッドロックプローブを、前記連結体と連環状に閉環するステップと、
- (5) 前記閉環したパッドロックプローブを検出するステップとを有することを特徴とする検出方法。

図1

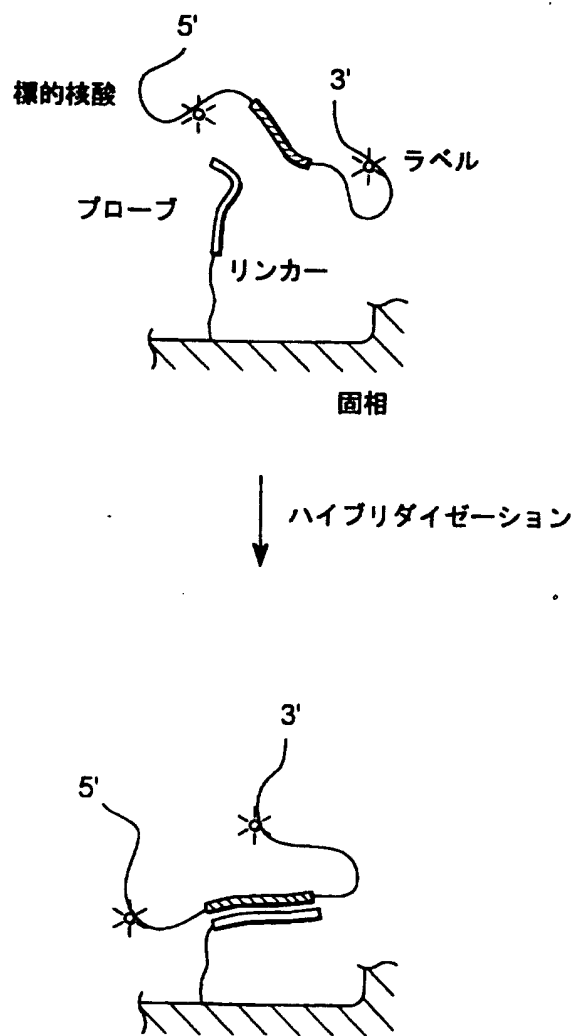


図2

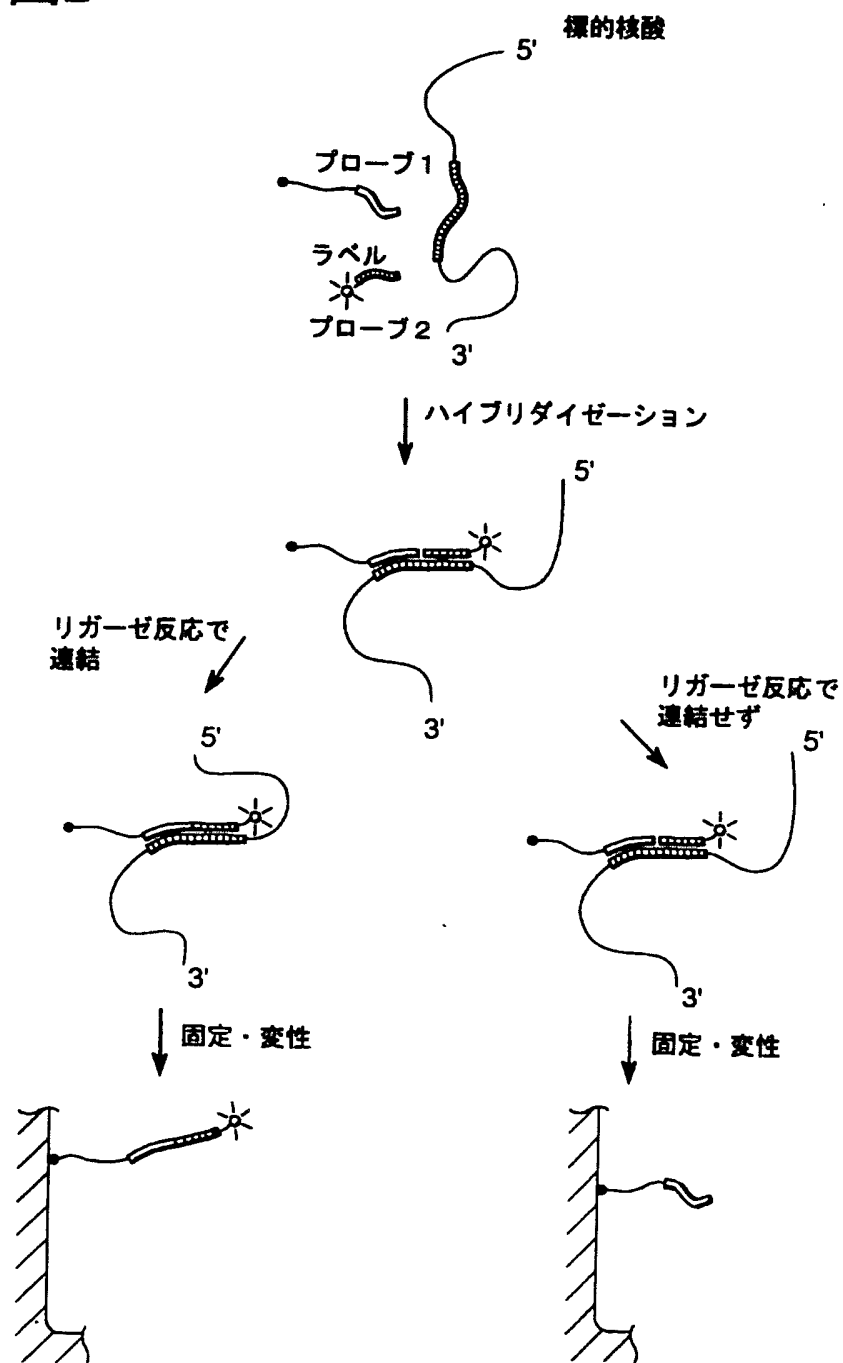


図3

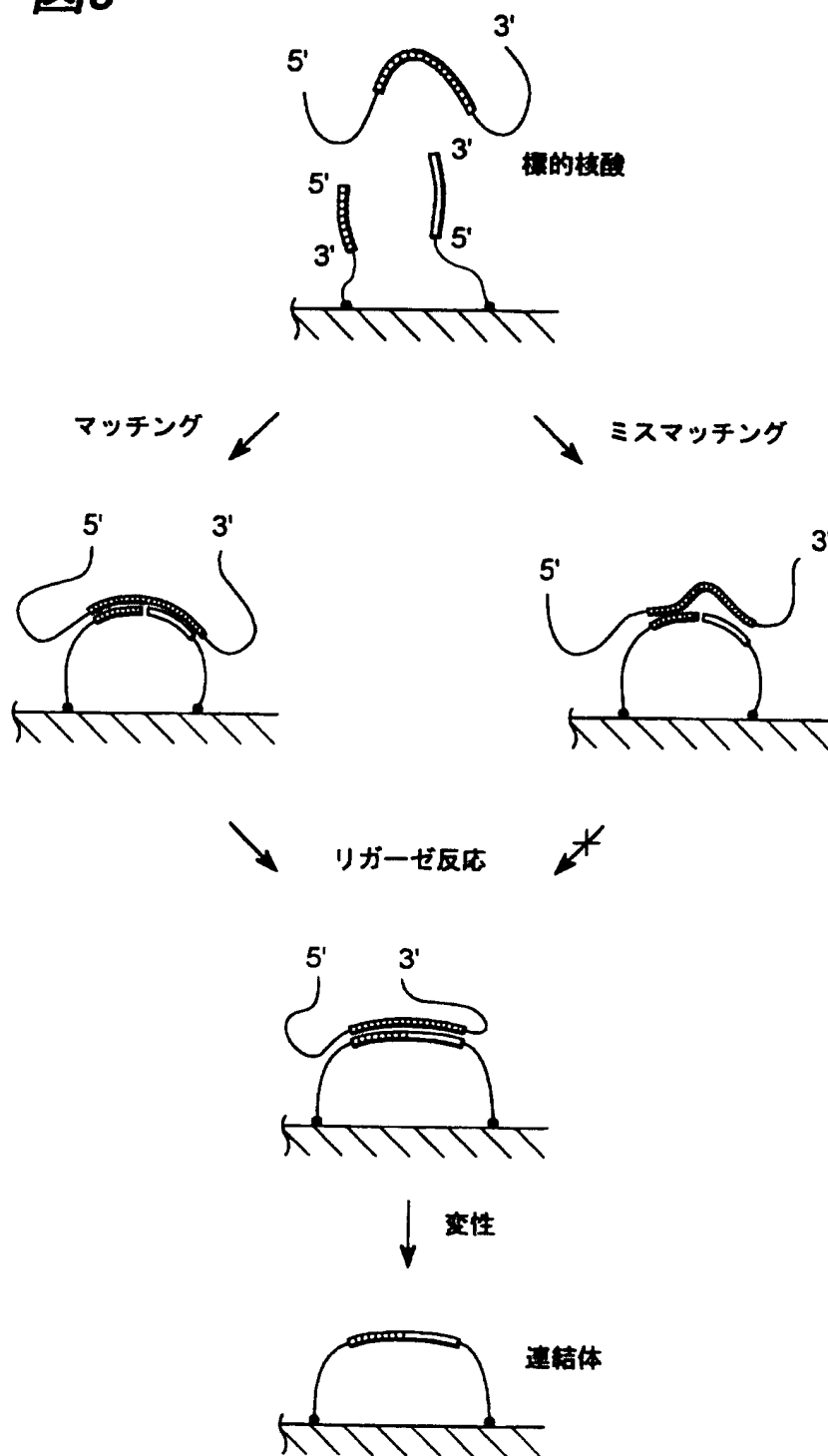


図4

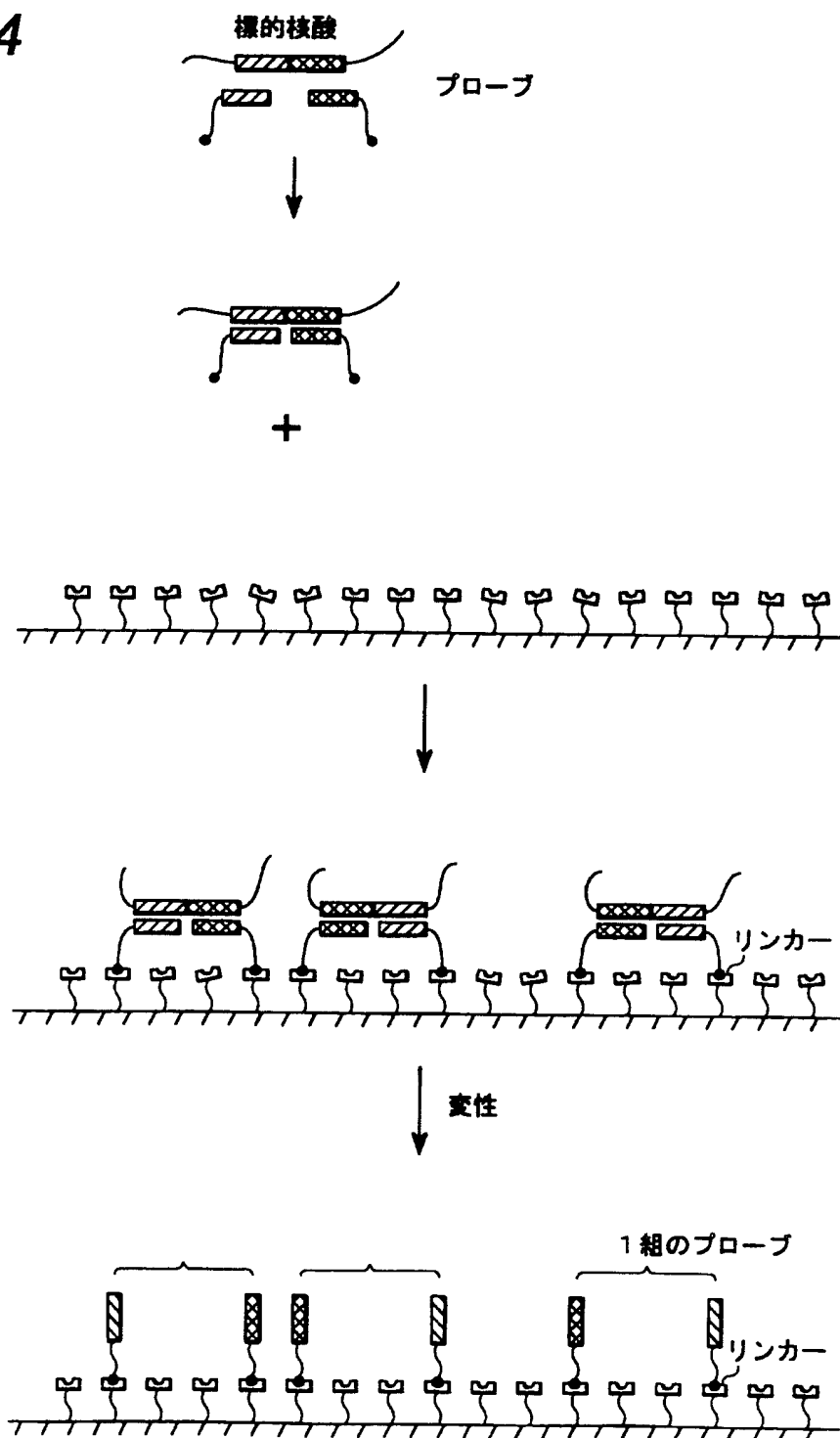


図5

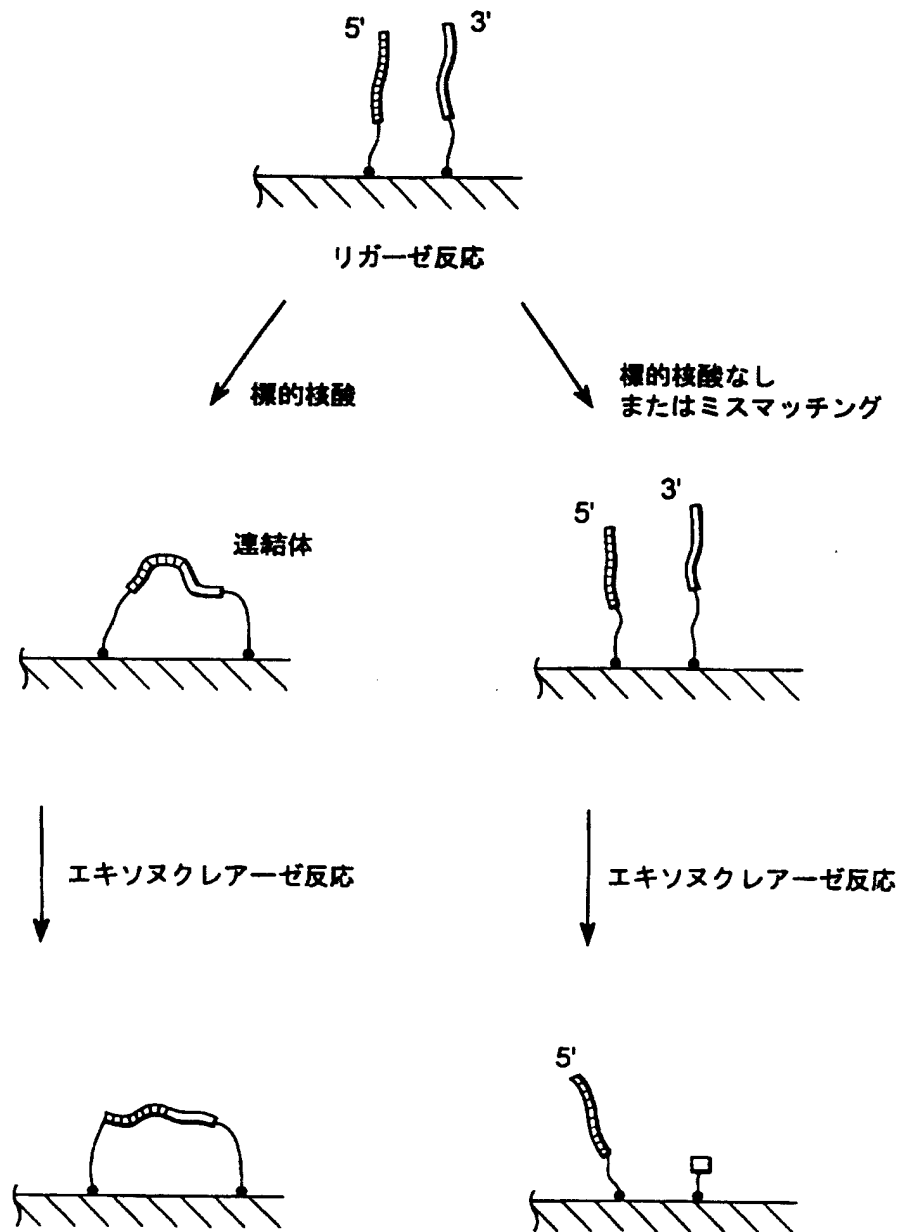


図6

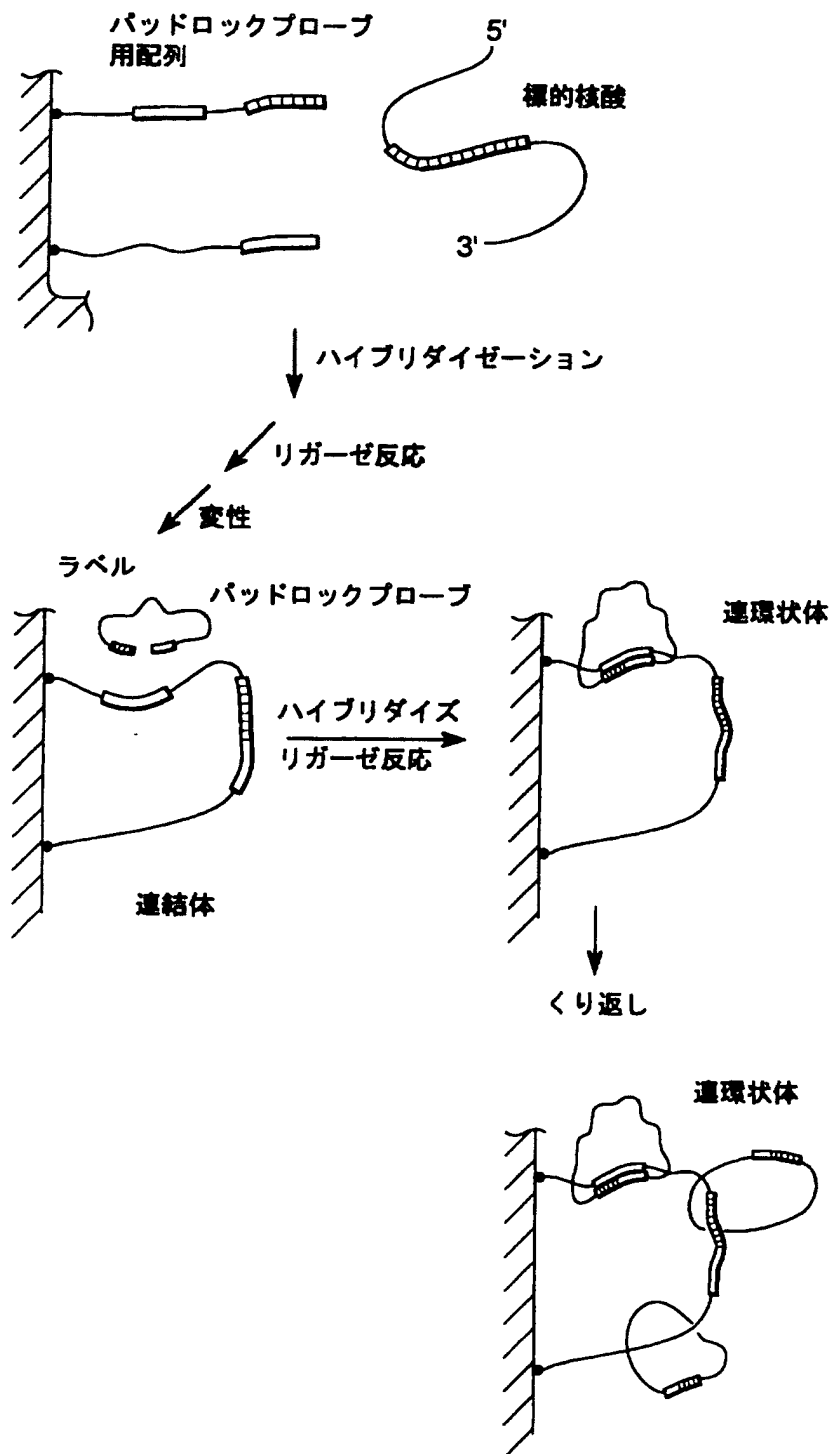
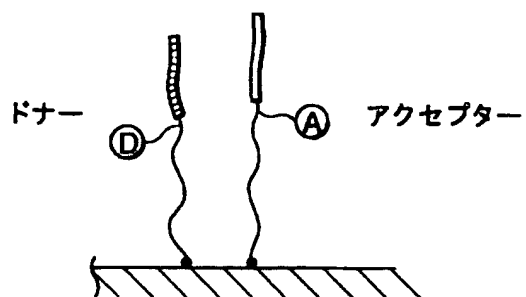
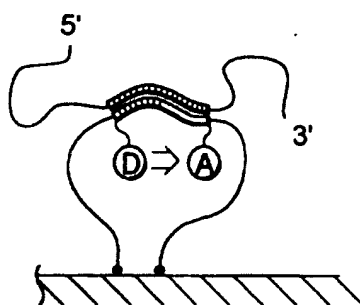


図7

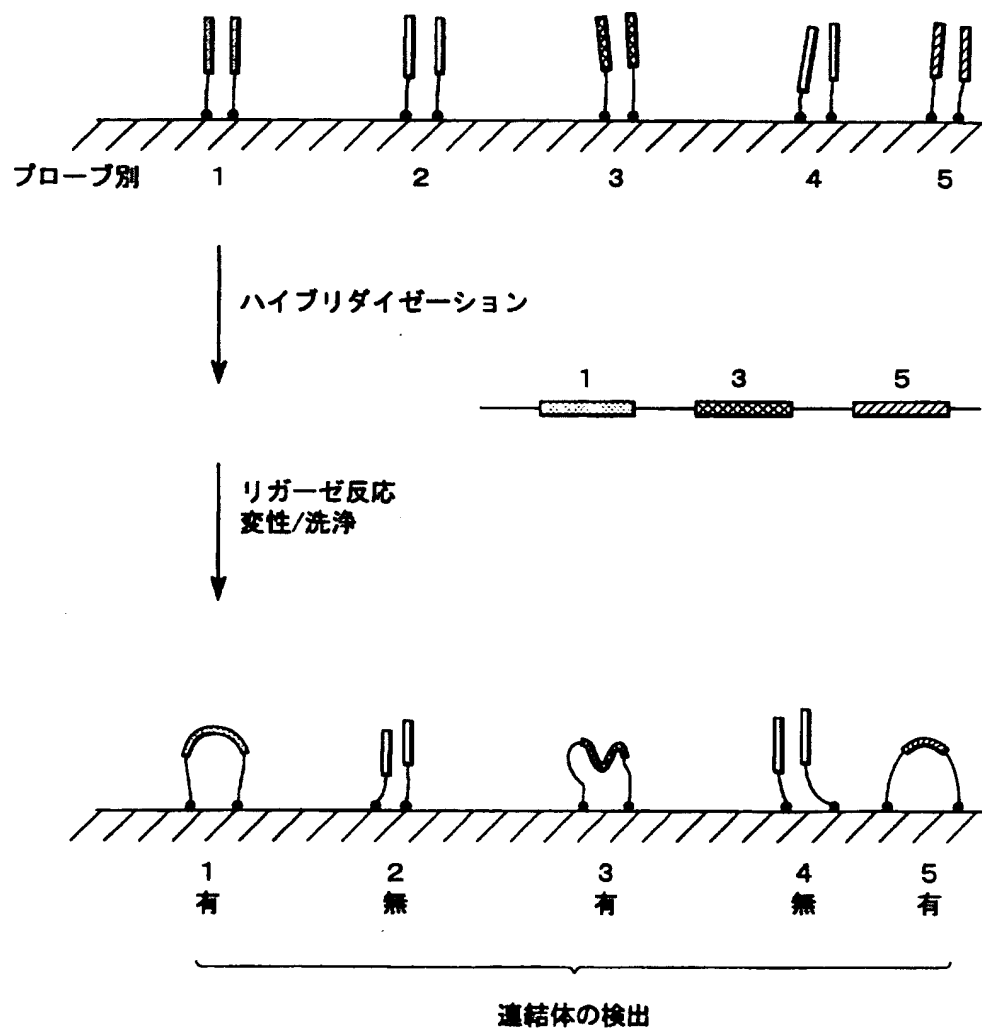


↓
標的核酸
リガーゼ反応



D→A相互作用

図8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/10, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00-11, C12Q1/68, G01N33/53-566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), GenBank (GENETYX)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, (1990), Deborah A. Nickerson et al., "Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay.", see p. 8923-8927	1 - 12
A	SCIENCE, Vol. 265, (1994), Mats Nisson et al., "Padlock Probs: Circularizing Oligonucleotides for Localized DNA Detection.", see p. 2085-2088	1 - 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 12, 1997 (12. 12. 97)

Date of mailing of the international search report

December 24, 1997 (24. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03232

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁸ C12N15/11、C12N15/10、C12Q1/68、G01N33/53、
G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁸ C12N15/00~11、C12Q1/68、G01N33/53~566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、CA(STN)、GenBank(GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, (1990), Deborah A. Nickerson et al., "Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay.", see p. 8923-8927	1-12
A	SCIENCE, Vol. 265, (1994), Mats Nissson et al., "Padlock Probs: Circularizing Oligonucleotides for Localized DNA Detection.", see p. 2085-2088	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.12.97

国際調査報告の発送日

24.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便 号100

東京都千代田区霞が関三丁目4 3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤真由美



4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448